

氏 名	清 水 公 徳
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 1013 号
学位授与の日付	平成 10 年 7 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	農学研究科農林生物学専攻
学位論文題目	Genetic Analysis of Melanin Biosynthesis in <i>Cochliobolus heterostrophus</i> and Its Application for Phylogenetic Study of Graminicolous <i>Helminthosporium</i> (トウモロコシごま葉枯病菌メラニン合成系の遺伝子解析とイネ科植物葉枯性病原菌群の系統分類への応用)
	(主査)
論文調査委員	教授 西岡孝明 教授 津田盛也 教授 古澤 巖

論 文 内 容 の 要 旨

農作物を糸状菌病から保護するにあたり、病原菌の正確な同定が不可欠である。トウモロコシごま葉枯病菌 (*Cochliobolus heterostrophus*, アナモルフ: *Bipolaris maydis*) をはじめとするイネ科植物葉枯性病原菌群はイネ科植物に葉枯性病害を引き起こす。しかし、分類基準となる分生子の形態的形質の絶対数が少なく、かつ微小なことから、種の同定は困難をきわめており、新たな分類基準の確立が急務となっている。また、病害防除をマニュアル化・簡略化する上で、菌類の属間・種間の系統関係を明らかにすることは非常に重要である。本研究では、多くの植物病原菌において生存する上で必要不可欠な二次代謝産物であり、耐久性、病原性発現などに機能しているメラニン合成に関するメンデル遺伝学および分子遺伝学的解析を行った。ついで、この解析で得られたメラニン合成系遺伝子の塩基配列の変異に基づくイネ科植物葉枯性病原菌群の種内・種間・属間の系統関係の解析を行った。本論文の主な内容は以下のとおりである。

1. トウモロコシごま葉枯病菌のメラニン合成系遺伝子の欠損変異株を分離し、遺伝学的解析を行った。欠損変異株のうちの1つ、アルビノ変異株803-18に関して、欠損株間および欠損株と野生型株間との交配実験およびメラニン中間代謝物添加実験により、*Cal 1*, *Cal 2*の2遺伝子を同定するとともに、2遺伝子の欠損によるメラニン合成経路上の閉塞部位はサイトロンより上流域にあることを明らかにした。これらの遺伝子のうちいずれか一方と既知のメラニン合成系遺伝子 *Brn 1* との間に連鎖関係を認めた。
2. *Brn 1* 遺伝子のクローニング、サブクローニングを行い、塩基配列を決定するとともに、転写産物の構造解析を行った。さらに、メラニン合成経路上の還元反応に関与する段階が閉塞されている *Brn 1* 遺伝子欠損変異株を用いた相補実験の結果と配列の相同性ことから、本遺伝子がポリケタイド系化合物の還元反応を触媒する還元酵素をコードしていることを明らかにした。
3. *Brn 1* 遺伝子のコーディング領域の上流および下流域の塩基配列から、異所的に分布、または宿主を異にするトウモロコシごま葉枯病菌8菌株にシングルバンドのPCR増幅産物を与えるようにプライマーを設計した。このプライマーを用いて増幅された領域の塩基配列には種内変異が認められなかったことから、本領域の塩基配列の比較が本菌の種同定に有用かつ簡便な解析方法であることを示した。
4. このPCR増幅産物を用いて、*Bipolaris* 属菌22種74菌株の *Brn 1* 遺伝子領域の塩基配列を決定した。その結果、同一種内の変異は極めて少なく、推定されたアミノ酸配列は完全に一致していた。この塩基配列から推定される系統関係は従来の形態形質に基づく分類とはいくつかの点で相違がみられた。例えば、*B. panici-miliacei* と *B. setariae*, *B. victoriae* と *B. zeicola* は、それぞれシノニムである可能性を示した。さらに、これまで分類学的取扱いに見解の相違がみられた29菌株について、それらの所属を決定した。

5. イネ科植物葉枯性病原菌群である *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* 属および植物病理学上重要な *Alternaria*, *Embellisia* 属所属菌27菌株の *Brn 1* 遺伝子領域の塩基配列を比較し、系統樹を作成した。得られたトポロジーから、*Alternaria*, *Drechslera*, *Embellisia*, *Exserohilum* 属は単系統群であること、*Bipolaris*, *Curvularia* 属は偽系統群であることを示した。また、これら諸菌群の中で、*Exserohilum* 属が最も早く分岐したグループであることや、進化に一定の方向性が認められることを考察した。

論文審査の結果の要旨

トウモロコシごま葉枯病菌をはじめとするイネ科植物葉枯性病原菌群は、イネ科植物に葉枯性病害を引き起こす植物保護上とくに重要な糸状菌群である。本研究では、トウモロコシごま葉枯病菌の生活史において重要な役割を担っているメラニン合成に関与する遺伝子群を遺伝学的に解析し、そのうちの1つ *Brn 1* 遺伝子の塩基配列を明らかにしている。さらにその塩基配列をイネ科植物葉枯性病原菌群の系統分類に応用したものである。本研究の成果として評価すべき点は以下のとおりである。

1. トウモロコシごま葉枯病菌のメラニン合成系欠損変異株を分離し、交配による遺伝学的解析を行い、メラニン合成に関与する2遺伝子 *Cal 1*, *Cal 2* を同定した。さらに、この2遺伝子の欠損による閉塞部位はメラニン合成経路上におけるサイタロンより上流域にあること、これらの遺伝子のいずれかが既知のメラニン合成系遺伝子 *Brn 1* と連鎖していることを明らかにした。

2. 本菌のメラニン合成に関与する遺伝子 *Brn 1* をクローニングし、塩基配列を明らかにするとともに、転写産物の構造解析を行った。さらに、メラニン合成経路上の還元反応段階が閉塞されている *Brn 1* 遺伝子欠損変異株を用いた相補実験の結果や、配列の相同性から、本遺伝子はポリケタイド系化合物の還元反応を触媒する酵素をコードする構造遺伝子であることを明らかにした。

3. 異所的に分布、または宿主植物を異にするトウモロコシごま葉枯病菌8菌株を供試して、*Brn 1* 遺伝子領域の塩基配列を調べた結果、イントロン部分を含め完全に一致することを明らかにした。

4. *Bipolaris* 属菌22種74菌株の *Brn 1* 遺伝子領域における塩基配列を調べて、本遺伝子領域が高い保存性を有していること、種内変異は少なく、本遺伝子領域の塩基配列が種の同定に有効な指標となることを示した。完全世代の形態は塩基配列から推定される系統関係を反映しているものの、分生子の形態は反映しているとはいえないことを示した。系統樹のトポロジーから、*B. panici-miliacei* と *B. setariae*, *B. victoriae* と *B. zeicola* は、それぞれシノニムである可能性を示した。さらに、これまで分類に見解の相違がみられた29菌株について、所属を決定した。

5. イネ科植物葉枯性病原菌群の *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* 属および *Alternaria*, *Embellisia* 属所属菌の *Brn 1* 遺伝子領域の塩基配列から作成された系統樹のトポロジーから、*Bipolaris*, *Curvularia* 属は系統関係を反映しない人為分類群であることを示した。また、形態形質および病原性の進化の方向性について示唆した。

以上のように本論文は、イネ科植物葉枯性病原菌群のメラニン合成経路の解明に多くの新知見を加えるとともに、分類学的に混乱のみられた本菌群の種同定、系統解析を分子レベルから検討しており、農業生物学および植物病理学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成10年5月27日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。